

Detecting temperature or metabolic activity of cells**Publication number:** DE19900135**Publication date:** 1999-08-05**Inventor:** SIMON SANFORD M (US)**Applicant:** UNIV ROCKEFELLER (US)**Classification:**

- International: G01N21/64; A61B5/01; G01K11/20; G01N33/483;
G01N33/50; G01N33/58; G01N21/64; A61B5/01;
G01K11/00; G01N33/483; G01N33/50; G01N33/58;
(IPC 1-7): G01N21/64; C12N5/00; G01N33/52

- European: G01K11/20; G01N33/50D; G01N33/58D

Application number: DE19991000135 19990105**Priority number(s):** US19980003628 19980107**Also published as:**

JP11258159 (A)

GB2333153 (A)

[Report a data error here](#)

Abstract not available for DE19900135

Abstract of corresponding document: GB2333153

The temperature of a cell is obtained by (a) placing a cell on a metabolic probe comprising a solid substrate containing a temperature-sensitive fluorophore embedded in a polymer, wherein when the fluorophore is excited with ultraviolet, visible or infrared light it emits a detectable fluorescent signal; and wherein when a living cell is placed on the metabolic probe, the fluorescent signal is effected by the metabolic rate of the cell; (b) exciting the fluorophore with ultraviolet, visible, or infrared light; and (c) detecting the fluorescent signal, wherein the intensity of fluorescent signal detected is indicative of the temperature of the cell. The measured temperature may be used to determine the metabolic activity of the cell and monitor any abnormality. Polymer is e.g. PMMA and the fluorophore may be Eu(TTA)₃.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

THIS PAGE BLANK (USPTO)



19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

12 Offenlegungsschrift
10 DE 199 00 135 A 1

51 Int. Cl.⁶:
G 01 N 21/64
G 01 N 33/52
C 12 N 5/00

21 Aktenzeichen: 199 00 135.9
22 Anmeldetag: 5. 1. 99
43 Offenlegungstag: 5. 8. 99

30 Unionspriorität:
09/003,628 07. 01. 98 US
71 Anmelder:
The Rockefeller University, New York, N.Y., US
74 Vertreter:
WINTER, BRANDL, FÜRNISS, HÜBNER, RÖSS,
KAISER, POLTE, Partnerschaft, 85354 Freising

72 Erfinder:
Simon, Sanford M., New York, N.Y., US*

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

- 54 Verfahren zur Bestimmung der Temperatur einer einzelnen Zelle in einer Zellprobe oder Gewebebiopsie sowie Verfahren zu dessen Verwendung
- 57 Die Erfindung offenbart ein neues Verfahren zur Bestimmung der Temperatur und/oder des metabolischen Zustands einer einzelnen Zelle, die in einer Zell/Gewebe-Probe enthalten ist. Das Verfahren beruht auf einem temperaturempfindlichen Fluorophor, welcher in ein Polymer eingebettet ist. Verfahren zur Überwachung des zellulären Metabolismus sowie eine damit zusammenhängende Diagnose sind eingeschlossen.

DE 199 00 135 A 1

DE 199 00 135 A 1

GEBIET DER ERFINDUNG

- 5 Die Erfindung betrifft allgemein ein neues Verfahren zur Bestimmung der Temperatur einer einzelnen Zelle oder einer Gruppe von Zellen in einer Gewebeprobe. Verfahren des Einsetzens dieses Verfahrens zur Diagnose sind ebenfalls umfaßt

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

10

Lebende Zellen benötigen eine stabile Stoffwechselgeschwindigkeit. Daher unterliegt sowohl in Zellen als auch in den Organismen, welche die Zellen enthalten, eine solche Regulation einer strengen Kontrolle. Ungefähr 50% der gesamten Energie in den Kohlenhydraten wird zu ATP umgewandelt, und der Rest wird als Wärme freigesetzt [Alberts et al., Molecular Biology of the Cell (1989)]. Das ATP wird dann wieder während des Wachstums zur Biosynthese verwendet und wird andernfalls für Arbeit verwendet, und die Energie wird als Wärme freigesetzt. Die Freisetzung dieser Wärme wird verwendet, um den Körper in der Form von Temperatur aufzuwärmen. Ein Unvermögen, auf dem Niveau eines Organismus ein stabiles Stoffwechsellniveau aufrechtzuerhalten, ist ein pathologischer Zustand, welcher als Fieber bezeichnet wird – ein Anstieg bei der Temperatur eines Organismus. Variationen bei den Stoffwechsellniveaus werden bei einer Vielzahl von pathologischen Zuständen angetroffen, einschließlich während bakterieller oder viraler Infektionen, bei Krebs und bei der allgemeinen Aufzehrung, welche während einer Sepsis oder Kachexie angetroffen wird.

Die Temperatur eines Organismus wird oft als Anzeichen für die Gesundheit des Organismus angesehen. Selbst geringe Abweichungen bei der Temperatur können einen pathologischen Zustand anzeigen. Jedoch kann die Temperatur einer einzelnen Zelle aufgrund der Beschränkung der derzeitigen Technologie nicht getestet werden. Somit ist es bisher nicht bekannt, in welchem Ausmaß die zelluläre Temperatur mit der Zeit innerhalb einer Zelle oder zwischen zwei verschiedenen Zellen variiert. Basierend auf Studien von großen Zellpopulationen gibt es jedoch gute Gründe anzunehmen, daß einige pathologische Zustände nachweisbar sein könnten, indem die Temperatur auf dem Niveau von einzelnen Zellen gemessen wird.

Der zelluläre Metabolismus kann als die Bilanz für alle enzymatischen Reaktionen betrachtet werden, welche in der Zelle auftreten. Innerhalb dieses Zusammenhangs wird die folgende exotherme Aktivität als die Strahlung eines schwarzen Körpers angesehen, d. h. die Wärme, welche wir testen, wenn wir die Temperatur der Zelle messen. Frühere Untersuchungen der biologischen Stoffwechselaktivität haben die Kalorimetrie verwendet, welche auf dem Niveau eines gesamten Organismus oder wenigstens eines einzelnen Organs eingesetzt wird. Die Mikrokolorimetrie kann für so geringe Mengen wie 10 Zellen angewendet werden. Jedoch gibt es ernste Beschränkungen bei der Grenze der derzeitigen Technologie, um die Wärmeproduktion von einzelnen Zellen aufzulösen [Kemp, Thermal and Energetic Studies of Cellular Biological Systems, A.M. James, Herausg. (Bristol: Wright), S. 147–166 (1987)]. Die empfindlichste Technik, welche auf die Messung des Stoffwechsels in Tumorzellen angewendet wird, ist der Cartesische Tauchapparat, welcher hunderte von Zellen auflösen kann [Lutton und Kopac, Cancer Res., 31: 1564–1569 (1971)]. Diese Technik ist jedoch noch zu grob, um eine heterogene Population von Zellen aufzulösen, und sie macht eine Trennung der Zellen nötig. Ein Großteil der normalen Zellphysiologie ist ein dynamischer Prozeß, welcher eine zelluläre Wechselwirkung in einer dreidimensionalen Matrix nötig macht. Viele Zellaktivitäten werden durch Zell-Zell-Kontakte modifiziert. All dieses geht verloren, wenn die Zellen getrennt werden. Neuere Techniken wurden entwickelt, um Metaboliten wie z. B. ATP, Glucose und Lactat in lebenden Zellen zu messen [Hossman et al., Acta Neuropathologica, 69: 139–147 (1986); Okada et al., Journal of Neurosurgery, 77: 917–926 (1992)]. Diese Techniken benutzen einen photographischen Film [Hossman et al., 1986, Supra; Okada et al., 1992, supra] oder photonenzählende Kameras [Tamulevicius und Streffer, British Journal of Cancer, 72: 1102–1112 (1995)] und haben eine beträchtliche Heterogenität beim Stoffwechsel in Tumoren gezeigt, wenn diese mit einer Auflösung von einem Millimeter Raumauflösung getestet wurden.

Unglücklicherweise gibt es derzeit eine Anzahl von wichtigen Problemen, welche nicht angegangen werden können, da der Metabolismus einer einzelnen Zelle nicht bestimmt werden kann. Beispielsweise können wir derzeit keine heterogenen Populationen von Zellen untersuchen und die Aktivität der einzelnen Zellen statt des Durchschnitts der Mischung auflösen. Beispielsweise besteht ein Tumor aus Krebszellen, normalen Zellen und eingedrunghenen Immunzellen, welche jeweils mit sehr unterschiedlichen Geschwindigkeiten metabolisieren. In diesem Fall kann die Messung des durchschnittlichen Metabolismus des Tumors nicht den tatsächlichen Metabolismus der einzelnen Zellen widerspiegeln. Bei den meisten Zellen ist die aerobe Atmung für fast die gesamte Produktion von ATP verantwortlich, wobei die anaerobe Glykolyse für den Rest aufkommt. Es wurde vor über fünfzig Jahren festgestellt, daß die anaerobe Atmung bei Ascites-Tumorzellen in Bezug auf Nichttumorzellen wesentlich erhöht ist [Warburg et al., The Metabolism of Tumors, Herausg. O. Warburg, Constable & Company LTD., London, S. 129–170 (1930a); Warburg et al., The Metabolism of Tumors, Herausg. O. Warburg, Constable & Company LTD., London, S.

254–265 (1930b)]. Dieses führte zu der Hypothese, daß die aerobe Atmung bei Tumorzellen geschädigt war [Warburg, Science, 123: 309–314 (1956)]. Als in den dazwischenliegenden Jahren mehr über den Stoffwechsel in Erfahrung gebracht wurde, wurde gefunden, daß die aerobe Atmung bei Tumorzellen normal ist, die anaerobe Atmung aber erhöht ist. Der Mechanismus, welcher für diesen Anstieg bei der anaeroben Atmung verantwortlich ist, ist derzeit nicht bekannt. Ein Hauptbegrenzungsfaktor beim Verstehen des Mechanismus ist die Unfähigkeit, die relativen Stoffwechsellniveaus von einzelnen Zellen zu testen. Wie oben erwähnt wurde, ist ein besonderes Problem, daß die Tumoren aus einer Mischung von normalen, bösartigen und Immunzellen bestehen. Die gegenwärtige Technologie erlaubt nur die Messung des durchschnittlichen Stoffwechsels dieser gemischten Population von Zellen. Ein zweites Problem ist die beträchtliche Heterogenität, sogar innerhalb der Tumorzellen. In Tumoren ist beispielsweise die Oxygenierung oft geschwindigkeitsbeschränkend für das Tumorstwachstum [Kallinowski et al., J. Cel. Physiol., 138: 183–191 (1989)]. Somit wird bei schnell wachsenden Tumoren das Wachstum durch die Angiogenese, das Wachstum neuer Blutgefäße für die Zufuhr von Sauer-

stoff und Nährstoffen, begrenzt.

Die Chemotherapie ist ein wirkungsvolles Werkzeug, das verwendet wird, um Tumoren zu bekämpfen. Jedoch entwickeln Tumorzellen häufig eine Resistenz gegenüber Chemotherapeutika. Diese Resistenz wird als eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber einem breiten Spektrum von chemotherapeutischen Mitteln beobachtet, und solche Zellen wurden als multiresistent bezeichnet [Simon et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 3497-3504 (1994)]. Obwohl diese Zellen ursprünglich als "Superzellen" angesehen wurden, welche in der Lage sind, jeglicher therapeutischen Herausforderung zu widerstehen, gibt es nun einen wachsenden Beweis dafür, daß multiresistente Zellen sich der Chemotherapie entziehen, indem sie sich mehr wie normale Zellen benehmen; und in mancher Hinsicht scheinen diese Zellen eine "umgekehrte" Transformation bei ihren Eigenschaften durchgemacht zu haben [Biedler et al., Cancer & Metastasis Reviews, 13: 191-207 (1994)]. Wenn die chemotherapeutischen Arzneimittel entfernt werden, kehren diese Zellen zu ihren aggressiven bösartigen Eigenschaften zurück. Es ist nicht bekannt, was mit dem Stoffwechsel von multiresistenten Zellen während dieser Periode passiert. Indirekte Ergebnisse weisen darauf hin, daß das Niveau der anaeroben Atmung bei diesen Zellen zu den Niveaus zurückgekehrt ist, welche bei nicht transformierten Zellen angetroffen werden [Miccadei et al., Oncology Research, 8: 27-35 (1996)]. Daher besteht ein Bedarf, den Stoffwechsel von einzelnen Zellen zu messen, welche multiresistent sind, um zu diagnostizieren, wann sich Tumoren aus ihrer ruhigen multiresistenten Phase in ein bösartigeres Stadium verlagern. Weiterhin besteht ein Bedarf, ein Verfahren zur Messung der Temperatur von einzelnen Zellen zur Verfügung zu stellen, um die metabolischen Änderungen zu bestimmen, welche entweder bei normalen oder Tumorzellen auftreten. Zusätzlich besteht ein Bedarf für eine Methodik zur Messung der Temperatur einer Zelle aus einer frischen Biopsie von lebendem Gewebe, um das Gewebe schnell auf das Vorliegen von Tumorzellen hin zu diagnostizieren.

Die Emission fast aller Fluorophore wird durch die Temperatur beeinflusst, jedoch würde die Verwendung von Fluorophoren, die für die Temperatur besonders empfindlich sind, zuerst von Kolodner et al., [Appl. Phys. Lett. 40: 782-784 (1982); Appl. Phys. Lett. 42: 782-784 (1983)] als eine Technik zur Kalibrierung der Temperatur verwendet. Kolodner verwendete einen Fluorophor, Eu(TTA)₃, welcher in ein Polymer, PMMA, eingebettet war, um Temperaturentwürfungen von 0,07°K und eine Raumaufklärung von 10 µm zu erreichen. Dieser temperaturempfindliche Fluorophor konnte somit verwendet werden, um Temperaturen zu quantifizieren.

Eine Vielzahl von Fluorophoren, einschließlich Eu(TTA)₃, wurde in verschiedenen Lösungsmitteln und Polymeren solubilisiert und verwendet, um Flugzeugflügel in dem Labor von John P. Sullivan (Pursue University, siehe Tabelle 1, modifiziert ausgehend von [Campbell et al., 1994, supra]) "anzustreichen". Die Änderung bei der Fluoreszenz kann verwendet werden, um beispielsweise die Temperaturänderungen des Flugzeugflügels in einem Windkanal zu überwachen. Bisher wurden temperaturempfindliche Fluorophore in der Diagnostik mit integrierten Schaltkreisen verwendet [Kolodner et al., Appl. Phys. Lett. 42: 117-119 (1983)], um einen Grenzflächenübergang bei einem zweidimensionalen Flügel festzustellen und um die Wechselwirkung zwischen den Vorderkantenwirbeln und der Oberfläche eines Deltaflügels sichtbar zu machen [Campbell et al., beim 6. Internat. Symp. über die Anwendungen der Lasertechnik auf die Strömungslehre, Lissabon, Portugal (1992); Campbell et al., Temperature Measurement Using Fluorescent Molecules, Abstract (1992); Campbell et al., Temperature Sensitive Fluorescent Paint Systems, 18: 94-2483 (1994); Hamner et al., A Scanning Laser System for Temperature and Pressure Sensitive Paint, 32: 94-0728 (1994)].

Die Zitierung von irgendwelchen Referenzen hierin sollte nicht als Zugeständnis ausgelegt werden, daß eine solche Referenz für die vorliegende Anmeldung als "Stand der Technik" verfügbar ist.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

Die vorliegende Erfindung stellt in ihrer breitesten Ausführungsform ein Mittel zum Messen der Temperatur einer Zelle unter Verwendung eines temperaturempfindlichen Fluorophors zur Verfügung. Die vorliegende Erfindung setzt eine Stoffwechselsonde ein, welche ein festes Substrat umfaßt, das einen temperaturempfindlichen Fluorophor eingebettet in ein Polymer enthält. Wenn der Fluorophor mit dem geeigneten ultravioletten, sichtbaren oder infraroten Licht angeregt wird, emittiert der Fluorophor ein nachweisbares Fluoreszenzsignal. Wenn eine lebende Zelle auf der Stoffwechselsonde angeordnet wird, wird die Intensität des Fluoreszenzsignals durch die Stoffwechselgeschwindigkeit der Zelle bewirkt.

Vorzugsweise enthält die Stoffwechselsonde einen Fluorophor, welcher während er in ein Polymer eingebettet ist, in der Nähe einer wäßrigen Lösung für wenigstens eine Stunde bei Anregung mit ultraviolettem Licht bei 37°C und bei ca. pH 7,5 ein stabiles Fluoreszenzsignal emittieren kann. In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung verursacht eine Zelle, welche auf der Stoffwechselsonde angeordnet wird, eine 2,5%ige Änderung bei der Intensität des Fluoreszenzsignals pro Grad Celsius Anstieg bei der Temperatur.

In einer Ausführungsform ist der temperaturempfindliche Fluorophor, welcher in der Stoffwechselsonde enthalten ist, Eu(TTA)₃. In einer anderen Ausführungsform ist das Polymer der Stoffwechselsonde Poly(methylmethacrylat). In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Polymer Poly(methylmethacrylat) und der temperaturempfindliche Fluorophor ist Eu(TTA)₃. Das feste Substrat der vorliegenden Erfindung kann aus irgendeinem inerten Material gefertigt werden, ist aber vorzugsweise ein Glas oder ein Kunststoff. In einer noch bevorzugteren Ausführungsform dieses Typs ist das feste Substrat ein Deckgläschen (glass cover slip).

Die vorliegende Erfindung stellt ein Verfahren zum Feststellen der Temperatur einer Zelle zur Verfügung. Eine solche Ausführungsform umfaßt ein Anordnen einer Zelle auf einer Stoffwechselsonde, welche ein festes Substrat umfaßt, das einen temperaturempfindlichen Fluorophor eingebettet in ein Polymer enthält. Wenn der Fluorophor mit dem richtigen ultravioletten, sichtbaren oder infraroten Licht angeregt wird, emittiert er ein nachweisbares Fluoreszenzsignal. Wenn eine lebende Zelle auf der Stoffwechselsonde angeordnet wird, wird die Intensität des Fluoreszenzsignals durch die Temperatur der Zelle bewirkt.

In einer spezifischen Ausführungsform dieses Verfahrens ist das Polymer ein nichtaromatisches synthetisches Polymer. In einer bestimmten Ausführungsform dieses Verfahrens kann der Fluorophor bei Anregung mit ultraviolettem

Licht für wenigstens eine Stunde bei 37°C, pH 7,4, ein stabiles Fluoreszenzsignal emittieren.

Die vorliegende Erfindung umfaßt ebenfalls ein Verfahren zum Feststellen der Stoffwechselaktivität einer Zelle. Eine solche Ausführungsform umfaßt ein Feststellen der Temperatur einer Zelle durch ein Anordnen der Zelle auf einer Stoffwechselsonde der vorliegenden Erfindung, Anregen des Fluorophors der Sonde mit dem geeigneten ultravioletten, sichtbaren oder infraroten Licht und Nachweisen des Fluoreszenzsignals, wobei die Intensität des Fluoreszenzsignals, welche nachgewiesen wird, ein Anzeichen für die Temperatur der Zelle ist. Die gemessene Temperatur wird dann mit der Stoffwechselaktivität der Zelle korreliert. In einer bevorzugten Ausführungsform dieses Typs ist die Zelle eine Tumorzelle.

Die vorliegende Erfindung umfaßt ebenfalls ein Verfahren zum Nachweisen des Vorliegens einer Tumorzelle in einem lebenden Gewebe, welches ein Feststellen der Temperatur der Zelle durch ein Anordnen der Zelle auf einer Stoffwechselsonde der vorliegenden Erfindung (wie oben beschrieben), Anregen des Fluorophors der Stoffwechselsonde mit dem geeigneten ultravioletten, sichtbaren oder infraroten Licht und Nachweisen des Fluoreszenzsignals umfaßt. Die Intensität des nachgewiesenen Fluoreszenzsignals kann mit der Temperatur der Zelle korreliert werden. Von dem Metabolismus von Tumorzellen ist bekannt, daß er signifikant höher ist als der von nicht transformierten Zellen. Die vorliegende Erfindung erlaubt den Nachweis von Tumorzellen mitten unter einer Masse von normalen (z. B. nicht transformierten) Zellen durch ein Bestimmen der Temperatur der Zellen. In einer bevorzugten Ausführungsform dieses Typs wird das lebende Gewebe aus einer Tumorbioptie erhalten. In einer verwandten Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Nachweisen des Vorliegens eines anomalen Metabolismus einer Zelle, welche von gesundem Gewebe umgeben ist (mitten unter einer Masse von normalen Zellen), zur Verfügung, welches ein Feststellen der Temperatur der Zelle durch ein Anordnen der Zelle auf einer Stoffwechselsonde der vorliegenden Erfindung (wie oben beschrieben), Anregen des Fluorophors der Stoffwechselsonde mit dem geeigneten ultravioletten, sichtbaren oder infraroten Licht und Nachweisen des Fluoreszenzsignals umfaßt. Ein Unterschied bei der Temperatur der Zelle in Bezug auf eine Kontrollzelle ist ein Anzeichen dafür, daß die Zelle einen anomalen Metabolismus durchmacht. In einer solchen Ausführungsform ist der anomale Metabolismus der Zelle ein Anzeichen für eine Zelle mit einer ultravioletten Schädigung. In einer anderen Ausführungsform ist der anomale Metabolismus der Zelle ein Anzeichen dafür, daß die Zelle eine Kachexie durchmacht. In einer dritten Ausführungsform ist der anomale Metabolismus der Zelle ein Anzeichen dafür, daß die Zelle eine Apoptosis durchmacht.

In einer bestimmten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird die Stoffwechselsonde auf einem Mikroskop angeordnet, der Fluorophor wird angeregt und seine Emission wird unter Verwendung des Mikroskops nachgewiesen. In einer solchen Ausführungsform ist das Mikroskop ein konfokales Lasermikroskop, das mit einem Ultraviolett-Laser zur Anregung ausgerüstet ist. In einer anderen solchen Ausführungsform ist das Mikroskop ein Fluoreszenzmikroskop, welches mit einer Hg/Xenon-Lampe mit einem Ultraviolett-Anregungsfilter und einem Emissionsfilter im sichtbaren Bereich mit $615 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$ ausgerüstet ist.

Die vorliegende Erfindung umfaßt ebenfalls ein Verfahren zur Herstellung der Stoffwechselsonden der vorliegenden Erfindung. Eine solche Ausführungsform umfaßt ein In-Kontakt-Bringen eines Polymers mit einem temperaturempfindlichen Fluorophor in einem mischbaren Lösungsmittel, worin eine Lösung des Fluorophors und des Polymers gebildet wird. Die Lösung wird als nächstes auf dem festen Substrat angeordnet, und das Polymer wird dann in das feste Substrat eingebrannt (annealed to).

Das feste Substrat, welches in diesem Verfahren verwendet wird, ist vorzugsweise ein Glas oder ein Kunststoff. In einer noch bevorzugteren Ausführungsform dieses Verfahrens ist das feste Substrat ein Deckgläschen. In einer bevorzugten Ausführungsform dieses Verfahrens wird das Deckgläschen in eine starke Säure (z. B. 70% Salpetersäure) eingetaucht, bevor der Polymer-Fluorophor auf dem Glasscheibchen angeordnet wird. In einer anderen Ausführungsform dieses Verfahrens wird das feste Substrat während des Einbrennens eines Polymers auf dem festen Substrat gedreht.

In noch einer anderen Ausführungsform dieses Verfahrens ist das verwendete Polymer Poly(methylmethacrylat). In noch einer anderen Ausführungsform dieses Verfahrens ist der temperaturempfindliche Fluorophor $\text{Eu}(\text{TTA})_3$. In noch einer anderen Ausführungsform ist das Lösungsmittel Nitroethan.

In einer besonderen Ausführungsform dieses Typs wird die Stoffwechselsonde durch ein Verfahren hergestellt, welches ein In-Kontakt-Bringen einer Lösung von 0,1 mM Poly(methylmethacrylat) in 96% Nitroethan mit 200 mM $\text{Eu}(\text{TTA})_3$ in 96% Nitroethan umfaßt. Die Fluorophor/Polymerlösung wird dann auf einem mit Säure gewaschenen Glasscheibchen angeordnet (welches vorher in 70%ige Salpetersäure eingetaucht wurde, mit destilliertem Wasser gewaschen wurde, mit Ethanol gespült wurde und dann in einem Vakuumofen getrocknet wurde). Das Glasscheibchen wird dann auf einem Rotor befestigt und gedreht. Das Glasscheibchen wird als nächstes bei 100°C für eine Stunde in einem Vakuumofen gebrannt, um das Polymer einzubrennen.

Diese und andere Aspekte der vorliegenden Erfindung werden besser durch Bezug auf die folgenden Zeichnungen und die detaillierte Beschreibung gewürdigt werden.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

Fig. 1 stellt die Änderung der Fluoreszenzintensität mit der Temperatur für $\text{Eu}(\text{TTA})_3/\text{PPMA}$ dar. Die Anregungswellenlänge war 365 nm und die Emissionswellenlänge war 621 nm.

Die Fig. 2A und 2C sind Zellen, wie sie in dem Beispiel beschrieben werden, sichtbar gemacht durch Absorptionsspektroskopie.

Die Fig. 2B und 2D stellen Fluoreszenzdifferenzspektren dar, welche aus den Zellen der Fig. 2A bzw. 2C erhalten wurden, nach der Zugabe von FCCP. Die Zellen wurden bei 355 nm angeregt, und die Emission wurde bei 614 nm überwacht.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

Die vorliegende Erfindung stellt Verfahren zur Verwendung einer Stoffwechselsonde, wie sie hierin beschrieben ist,

zur Verfügung, um die Temperatur und/oder metabolische Änderungen einer einzelnen Zelle oder einer Gruppe von Zellen zu überwachen. Die Zelle kann entweder von anderen Zellen losgelöst sein oder ein Teil einer Zellprobe sein. Wenn die Zelle eine Tumorzelle ist, hilft eine solche Überwachung bei dem Verständnis der Zellbiologie von Tumorzellen. Die Stoffwechselsonden und die damit zusammenhängende Methodik der vorliegenden Erfindung können ebenfalls verwendet werden, um zu bestimmen, ob Tumorzellen in einer frischen Biopsie von lebendem Gewebe vorhanden sind, in einem Zeitrahmen, welcher erlauben würde, daß die Diagnose während der Tumorbiose erhalten wird. Auf diese Weise könnte die Analyse der Biopsie unmittelbar nach der Entfernung des Gewebes durchgeführt werden, was dem praktizierenden Arzt erlaubt, unmittelbar eine Entscheidung zu treffen, ob weiteres Gewebe entfernt werden muß, oder alternativ um zu bestimmen, daß keine weitere Operation nötig ist. Ein solches Verfahren hat viele Vorteile gegenüber der gegenwärtigen Technologie, welche eine anfängliche Biopsie nötig macht, dann typischerweise eine 7- bis 10-tägige Untersuchung des Gewebes, auf welche in vielen Fällen ein weiterer chirurgischer Eingriff folgt. Somit erlaubt die vorliegende Erfindung, daß der praktizierende Mediziner einen chirurgischen Eingriff durchführt und sofort auf die Gewebeanalyse reagiert, wodurch eine weitere Verschlechterung des Gewebes während der Zeitspanne der Analyse verhindert wird.

Die vorliegende Erfindung umfaßt ebenfalls Verfahren zum Feststellen der Temperatur einer Zelle unter Verwendung der Stoffwechselsonden der vorliegenden Erfindung. Die Stoffwechselsonden der vorliegenden Erfindung umfassen ein festes Substrat, welches einen temperaturempfindlichen Fluorophor enthält, der in ein Polymer eingebettet wurde. Wenn der Fluorophor mit dem geeigneten ultravioletten; sichtbaren oder infraroten Licht angeregt wird, emittiert er ein nachweisbares Fluoreszenzsignal. Dieses Fluoreszenzsignal wird durch die Stoffwechselgeschwindigkeit einer Zelle bewirkt, welche auf der Stoffwechselsonde angeordnet ist. Somit kann durch ein Anregen des Fluorophors mit dem geeigneten Licht und dann einem Nachweisen der Intensität des Fluoreszenzsignals die Temperatur der Zelle bestimmt werden.

Daher sollen die folgenden Begriffe, wenn sie hierin erscheinen, die unten aufgeführten Definitionen aufweisen:

Wie hierin verwendet, umfaßt eine "Stoffwechselsonde" ein festes Substrat, welches einen temperaturempfindlichen Fluorophor eingebettet in ein Polymer enthält, worin, wenn der Fluorophor mit der geeigneten Lichtwellenlänge angeregt wird (z. B. ultraviolett, sichtbar oder infrarot), der Fluorophor ein nachweisbares Fluoreszenzsignal emittiert und worin, wenn eine lebende Zelle (allein, oder als ein Teil einer Zellprobe) auf der Stoffwechselsonde angeordnet wird, das Fluoreszenzsignal aufgrund der Wärme, welche von der Zelle emittiert wird (z. B. wie als die Temperatur und/oder der metabolische Zustand der Zelle gemessen wird), potenziert wird (d. h. steigt oder fällt).

Wie hierin verwendet, kann ein "festes Substrat" aus irgendeinem festen Material gefertigt werden, vorzugsweise einem Kunststoff, Metall oder Glas, und noch bevorzugter, einer Glaslinse.

Wie hierin verwendet, umfaßt "ca. pH 7,5" pH 7,0 bis pH 8,0.

Bei einer Anwendung der vorliegenden Erfindung wird die Temperatur einer Zelle bestimmt, welche aus einer Zellprobe von einem Patienten erhalten wurde, der in dem Verdacht stand, an Kachexie zu leiden. Kachexie ist ein Krankheitszustand, welcher den Körper auszehrt und oft tödlich endet. Kachexie, welche durch den Tumornekrosefaktor ausgelöst wird, ist mit einer erhöhten Produktion von Milchsäure verbunden und es wird angenommen, daß sie das Ergebnis der Aktivierung eines nutzlosen Substratzyklus zwischen Fructose-6-phosphat und Fructose-1,6-bisphosphat ist. Dieser verbrennt das zelluläre ATP [Zentella et al., Cytokine, 5: 436-447 (1993)]. Somit ist eine Bestimmung einer erhöhten Temperatur für Zellen, welche von einem Patienten erhalten wurden, der in dem Verdacht steht, eine Kachexie zu haben, mit der Diagnose einer Kachexie konsistent.

Unter einem anderen Aspekt der vorliegenden Erfindung kann der Mechanismus eines induzierten Fiebers durch das entzündliche Makrophagenprotein sondiert werden. Das Fieber kann in Tieren durch einen Faktor hervorgerufen werden, welcher von Makrophagen freigesetzt wird: das entzündliche Makrophagenprotein [Myers et al., Neurochemical Research, 18: 667-673 (1993)]. Während bekannt ist, daß dieser Faktor die Nahrungsaufnahme durch das Tier moduliert, ist derzeit noch nicht bekannt, wo oder wie diese Wirkungen auf die Zellen aufweisen, um den Stoffwechsel zu erhöhen und die Temperatur zu erhöhen. Somit kann die Bestimmung, welche bestimmten Zellen (oder Zelltypen) die überschüssige Wärme emittieren, die das Fieber verursacht, erreicht werden, indem die Temperatur der einzelnen Zellen (oder des Zelltyps) festgestellt wird.

Unter einem besonderen Aspekt der vorliegenden Erfindung wird die Temperatur von kultivierten Zellen bestimmt. In einer solchen Ausführungsform werden Populationen von Brusttumorzellen verwendet. In einer weiteren solchen Ausführungsform werden arzneimittelresistente Brusttumorzellen verwendet. In noch einer anderen Ausführungsform werden nicht transformierte Brustzellen verwendet. In einer bevorzugten Ausführungsform werden zwei dieser Zelltypen verwendet. In einer noch bevorzugteren Ausführungsform werden alle drei Zelltypen verwendet. In einer bevorzugten Ausführungsform kommen die Brusttumorzellen aus einer humanen Quelle. In einer besonderen Ausführungsform werden braune Fettgewebszellen aus der Tumorzelllinie HIB 1B verwendet.

In einer weiteren Ausführungsform dieses Aspekts der Erfindung wird ein Scheibchen des Brustgewebes als die Quelle von Zellen verwendet. Ein Scheibchen von der Brust umfaßt Fettzellen (welche mit großen Fettglobuli gefüllt sind, die sehr niedrige Stoffwechselsniveaus aufweisen) und Duktuszellen, welche aktiv metabolisieren und sezernieren. Die Grundgeschwindigkeit des Stoffwechsels der Tumorzellen ist signifikant höher als die von "normalen" Zellen. Tests unter Verwendung einer Oberflächentemperaturmessung von Hauttumoren zeigen eine Temperaturdifferenz (bei Belichtung) von bis zu 3,3°C.

In der gegenwärtigen medizinischen Praxis wird herausgeschnittenes Gewebe, welches während einer Biopsie erhalten wurde, für histologische Tests präpariert, welche 7-10 Tage dauern. Somit befindet sich der Patient nicht mehr im Operationsraum, wenn die Ergebnisse bestimmt werden. Daher muß oft eine nachfolgende Operation angesetzt werden. Das Verfahren des Feststellens der Temperatur von Zellen in den Scheibchen unter Verwendung der Methodik der vorliegenden Erfindung erlaubt, daß die Zellen in den Gewebescheibchen sofort getestet werden, wobei ein standardmäßiges Fluoreszenzmikroskop verwendet wird, um zu bestimmen, ob es lokalisierte "Hot spots" einer Stoffwechselaktivität (d. h. Zellen, welche größere als die normalen Mengen an Wärme emittieren) als einen Fingerzeig für Tumorzellen gibt. Solche Bestimmungen erlauben dem Chirurgen, unmittelbar zu entscheiden, ob oder nicht weiteres Gewebe herausgeschnitten werden muß.

Noch ein anderer Aspekt der Erfindung umfaßt die Bestimmung der Temperatur/des Metabolismus von einzelnen Zellen, um die Verschiebung von ruhigen multiresistenten Zellen zu dem bösartigeren Zustand hin zu überwachen. In diesem Fall wäre ein Ansteigen der Temperatur mit einer solchen Verschiebung konsistent. Ein solches Überwachen wäre während einer Chemotherapie und insbesondere nach dem Ende einer solchen Behandlung besonders nützlich.

5 In einer bestimmten Ausführungsform wird eine Zell- oder Gewebebiopsie auf einer Stoffwechselsonde angeordnet und dann mit einem konfokalen Lasermikroskop erfaßt, das mit einem Ultraviolett-Laser zur Anregung ausgerüstet ist, was gleichzeitige Emissionsmessungen von dem temperaturempfindlichen Fluorophor erlaubt. In einer weiteren solchen Ausführungsform wird die Erfassung mit einem Fluoreszenzmikroskop durchgeführt, das mit einer Hg/Xenon-Lampe mit einem Ultraviolett-Anregungsfilter und einem Emissionsfilter im sichtbaren Bereich ausgestattet ist.

10 Wie oben erwähnt wurde, ist ein bevorzugter Fluorophor $\text{Eu}(\text{TTA})_3$, welcher ein Anregungsmaximum von 360 nm aufweist und ein Emissionsmaximum von 614 nm aufweist. Noch bevorzugter wird $\text{Eu}(\text{TTA})_3$ mit dem Polymer Poly(methylmethacrylat), (PMMA), kombiniert und in ein festes Substrat eingebracht, um eine Stoffwechselsonde zu bilden. Jedoch werden andere geeignete Kombinationen durch die vorliegende Erfindung abgedeckt. Solche möglichen Kombinationen sind beispielhaft in Tabelle 1 dargestellt. Diese und andere Kombinationen können getestet werden, um
15 ihre Eignung zu bestimmen, als Komponenten der Stoffwechselsonde zu dienen. Insbesondere sind die Schlüsselkriterien zur Auswahl einer Fluorophorverbindung die, daß der Fluorophor: (i) eine maximale Änderung der Fluoreszenz bei einer Änderung der Temperatur bei 37°C zeigt; (ii) die Fähigkeit aufweist, in einem Polymer und abseits von der wäßrigen Lösung eingebettet zu werden; und (iii) für lebende Zellen nicht toxisch ist. Somit kann ein solches Testen das Bestimmen der Empfindlichkeit des Fluorophors auf Temperaturänderungen bei 37°C, die Stabilität des Fluorophors in einer wäßrigen Umgebung, die Stabilität des Fluorophors während des Einbettens in das Polymer und die Beständigkeit
20 des Fluorophors gegenüber einem Ausbleichen durch Licht (eine solche Beständigkeit wird für Langzeitbeobachtungen und anschließende Kalibrierungen benötigt) umfassen. Je größer die Empfindlichkeit des Fluorophors gegenüber einer Temperaturänderung bei 37°C ist, je größer seine Stabilität unter den oben erwähnten Bedingungen ist, einschließlich einer Resistenz gegenüber dem Ausbleichen durch Licht, desto mehr ist der Fluorophor als ein Bestandteil der Stoffwechselsonde geeignet. In ähnlicher Weise wird das Polymer so ausgewählt, daß es eine optimierende Wirkung auf den temperaturempfindlichen Fluorophor aufweist. Schließlich muß die Fluorophor/Polymer-Kombination mit den lebenden Zellen kompatibel sein, d. h. sie sollten die Lebensfähigkeit der Zellen nicht nachteilig beeinflussen. In dem nachfolgenden Beispiel werden diese und/oder andere Faktoren beschrieben.

Die vorliegende Erfindung kann besser durch Bezug auf das folgende nicht beschränkende Beispiel verstanden werden, welches als beispielhaft für die Erfindung angegeben wird. Das folgende Beispiel wird dargestellt, um die bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung vollständiger darzustellen. Es sollte jedoch nicht so ausgelegt werden, daß es den breiten Umfang der Erfindung beschränkt.

BEISPIEL

35

Bestimmung von geeigneten Fluorophoren und Polymeren für eine Stoffwechselsonde

Einführung

40 Mehrere Kriterien wurden aufgestellt, um einen geeigneten Fluorophor und ein Polymer für die Stoffwechselsonden der vorliegenden Erfindung auszuwählen. Beispielsweise ist die Empfindlichkeit des Fluorophors für Temperaturänderungen bei 37°C ein wichtiges Kriterium, wobei eine größere Empfindlichkeit wünschenswert ist. In ähnlicher Weise wird der Fluorophor im Hinblick auf seine Stabilität in einer wäßrigen Umgebung ausgewählt, da eine lebensfähige Zelle in einer wäßrigen Umgebung am stabilsten ist. Zusätzlich wird ein Fluorophor im Hinblick auf seine Stabilität während
45 seiner Einbettung in ein Polymer ausgewählt. Beispielsweise müssen die Zellproben durch eine Dicke des Polymers von ungefähr 50 nm von dem Fluorophor getrennt werden, um sicherzustellen, daß Änderungen der Fluoreszenz eine Folge der Temperaturemission von der Zelle sind, und nicht von einer Sezernierung eines Proteins, Metaboliten oder Ions, welche die Eigenschaften des Fluorophors modifizieren könnten.

Weiterhin wird ein Polymer ausgewählt, welches die Eigenschaften unseres temperaturempfindlichen Fluorophors optimiert. Ein solches Polymer sollte im Hinblick auf die relative Beständigkeit gegenüber einem Ausbleichen durch Licht (eine Eigenschaft, welche für Langzeitbeobachtungen und nachfolgende Kalibrierungen nötig ist) ausgewählt werden. Weiterhin sollten ein Polymer und der Fluorophor mit lebenden Zellen kompatibel sein, um sicherzustellen, daß das Polymer und der Fluorophor die Lebensfähigkeit der Zelle nicht nachteilig beeinflussen.

55

Materialien und Methoden

Beschichten von Deckgläschen mit temperaturempfindlichen Fluorophoren

Materialien

60

Farbstoff: Europiumthenoyltrifluoracetat, abgekürzt als $\text{Eu}(\text{TTA})_3$ oder EuTTA (Advanced Materials, New Hill, NC)
Polymer: Poly(methylmethacrylat), abgekürzt als PMMA (Aldrich, Milwaukee, WI 18,226-5)
Lösungsmittel: 96% Nitroethan (Aldrich, Milwaukee, WI 13.020-6)

65

Mischen von Farbstoff/Polymer

Die Standardkonzentration des Polymers (PMMA) in dem Lösungsmittel (Nitroethan) betrug 0,1 mM (100 mg PMMA in 5 ml Nitroethan). Verschiedene Konzentrationen von $\text{Eu}(\text{TTA})_3$ wurden verwendet. Das beste Fluoreszenzsi-

gnal war das mit 200 mM Eu(TTA)₃ in Lösungsmittel (100 mg EuTTA in 5 ml Nitroethan). Die Farbstoff/Polymermischung wurde mit einem Magnetrührer gerührt, bis sie vollständig gelöst war, und dann durch einen Filter mit 0,45 µm Porengröße filtriert (Gelman Sciences, Acrodisc 13CR PTFE), wonach eine völlig klare Lösung zurückblieb. Um Probleme mit einer Hydratisierung zu minimieren, wurden der Farbstoff und das Polymer unter N₂ gelagert und das Lösungsmittel wurde mit Molekularsieben gelagert.

Die Dicke der Schicht kann eingestellt werden, indem die Polymerkonzentration (je höher, desto dicker) und die Rotationsgeschwindigkeit (je langsamer, desto dicker) variiert werden.

Vorbereitung der Deckgläschen

Alle Deckgläschen wurden in Salpetersäure mit Säure gewaschen. Die Deckgläschen wurden für 5 Minuten in 70%ige Salpetersäure eingetaucht, mit dH₂O gespült, mit 95% Ethanol gespült und dann in einem Vakuumofen bei 100°C getrocknet. Die Säurewäsche war nötig, damit das Polymer-Fluorophor fest und stabil auf dem Glas verankert blieb.

Rotationsbeschichtungsverfahren. Das Deckgläschen wurde auf einem Rotor befestigt und mit der Polymer/Fluorophor/Lösungsmittelprobe bedeckt. Das Deckgläschen wurde mit einer typischen Geschwindigkeit von 600 Upm für 1 Minute rotiert. Das Deckgläschen wurde dann für eine Stunde bei 100°C in einem Vakuumofen gebrannt, um das Polymer einzubrennen.

Charakterisierung der Beschichtungen. Die Beschichtungen auf den Deckgläschen wurden durch mehrere Verfahren charakterisiert. Die Homogenität wurde unter einem Phasenkontrastmikroskop getestet, wobei ein 20x- oder ein 40x-Objektiv verwendet wurde. Die Homogenität wurde ebenfalls unter einem Fluoreszenzmikroskop (Nikon Diaphot) getestet, wobei ein 40x-Objektiv verwendet wurde, oder auf einem konfokalen Lasermikroskop (Ultima, Meridian Instruments, Okemos, MI), wobei ein 60x-Objektiv verwendet wurde. Die Absorption der beschichteten Deckgläschen wurde bei 365 nm mit einem Diodenarrayspektrophotometer (Milton Roy Spectronic, Array 3000) getestet. Die Temperaturempfindlichkeit der verschiedenen Mischungen von Fluorophoren, Polymeren, Lösungsmitteln wurde anfangs in einer Küvette mit einer kontrollierten Temperatur in einem Fluoreszenzspektrofluorimeter (Aminco Bowman 2, SLM Aminco) getestet. Die Deckgläschen wurden geschnitten und bei einem Winkel von 45 Grad in die mit Wasser gefüllten Küvetten eingepaßt. Diese Konfiguration wurde verwendet zur Bestimmung von:

- dem optimalen Anregungs- und Emissionsspektrum durch ein Aufzeichnen von Anregungs- und Emissionsabtaugen;
- der Geschwindigkeit des Ausbleichens durch Licht und der Stabilität der Schicht in Wasser (getestet durch ein Aufzeichnen des durchschnittlichen Fluoreszenzsignals über die Zeit); und
- dem Temperaturkoeffizienten (Änderung der Intensität pro Grad), welcher durch ein Aufzeichnen der Änderungen der Fluoreszenzintensität während Temperaturänderungen von normalerweise 1°C bestimmt wurde.

Zellwachstum auf den Deckgläschen

Zellen der humanen Brusttumormlinie MCF-7 wurden auf den Beschichtungen wachsen gelassen. Die Wachstumsgeschwindigkeit auf den Beschichtungen war etwas langsamer als auf der Polystyroloberfläche der Kulturschalen, aber die Lebensfähigkeit war höher als 80%.

Zellkultur

Die MCF-7/ADR-Zellen sind eine Zelllinie, die gegenüber Chemotherapeutika resistent ist und welche von einem humanen Brustkarzinom abgeleitet ist. Sie werden in modifiziertem Eagle-Medium mit Phenolrot, Rinderinsulin 10 µg/ml und L-Glutamin und 10% FBS in einem befeuchteten Inkubator bei 37°C und 5% pCO₂ (Forma Scientific, OH) aufrechterhalten. Zusätzlich werden die MCF-7/ADR-Zellen kontinuierlich in 0,8 µM Adriamycin gehalten.

Die Zellen werden in einem Olympus-Fluoreszenzmikroskop beobachtet, welches mit einer Xenon-Lampe, einem Uniblit-Verschluß (Vincent and Associates, Rochester NY) und Filterrädern auf der Anregungs- und Emissionsseite ausgestattet ist. Das Verschließen der Lichtquelle wird mit einem Computer gesteuert. Ein Filterhalter wurde hergestellt, um die 450 nm- und 490 nm-Anregungsfilter zu halten. Die Daten werden auf einer gekühlten ladungsgekoppelten Vorrichtung Hamamatsu 4972 (Hamamatsu Photonics) gesammelt und mit einer Software digitalisiert, welche von National Instruments Lab View geschrieben wurde. Die Zellen werden in einer Kammer mit kontrollierter Temperatur bei einer konstanten Perfusion von Medium sichtbar gemacht.

Die Zellen werden mit einer λ_{ex} von 355 nm und einer λ_{em} von 614 angeregt. Wenn das Verhältnis von aufeinanderfolgenden Bildern aufgenommen wurde, konnten die Zellen nicht nachgewiesen werden. Bei Einschluß von FCCP, einem Protonenionophor, welcher die Protonendurchlässigkeit der Mitochondrien erhöht und somit die Hydrolyse von ATP erhöht, gibt es jedoch eine erhöhte Fluoreszenzemission, die mit einem Anstieg der Temperatur konsistent ist. Der größte Anstieg der Temperatur beträgt ungefähr 100 mK und er wird sehr folgerichtig in dem Wachstumskegel der Zelle beobachtet (Fig. 2B und 2D).

Fluoreszenzmessungen

Die Fluoreszenzmessungen wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop durchgeführt, welches mit einer Hg/Xenon-Lampe ausgerüstet war, wobei ein Ultraviolett-Anregungsfilter und ein Emissionsfilter verwendet wurden. Eu(TTA)₃ wird bei 360 nm angeregt und emittiert bei 614 nm.

Wahl der fluoreszierenden Verbindung: Es war notwendig, das gesamte Wasser in dem Lösungsmittel und Polymer zu entfernen, bevor die Deckgläschen beschichtet wurden. Unglücklicherweise beeinträchtigt Wasser nachteilig die Stabilität der Fluorophor/Polymermischung, und viele der häufig verwendeten Reagenzien, um das Lösungsmittel zu dehydrieren, beeinträchtigen ebenfalls nachteilig die Fluorophore. Ein Schlüssel war, einen Fluorophor zu verwenden, welcher ohne nachteilige Wirkungen mit Dehydratisierungsreagenzien behandelt werden konnte. Es stellte sich heraus, daß einer der möglichen Fluorophore (Eu-FOD) größere Änderungen in den Eigenschaften durchmachen würde, wenn wir ihn auf die Deckgläschen brannten. Eu(TTA)₃ wies dieses Problem nicht auf und wurde daher als ein guter Fluorophor ausgewählt.

Wahl des Polymers: Die Fluorophore, welche untersucht wurden, ändern ihre Fluoreszenz als Reaktion auf die Temperatur. Jedoch könnte ihre Fluoreszenz ebenso für bestimmte Proteine, Kohlenhydrate, pH oder ionische Änderungen empfindlich sein. So wird der Fluorophor in ein Polymer eingebettet, das verwendet wird, um die Deckgläschen zu beschichten. Polystyrol war unsere erste Wahl für ein Trägerpolymer. Es ist stabil gegenüber vielen verschiedenen Behandlungen, es ist nicht toxisch, es kann als ein Substrat für wachsende Zellen verwendet werden. Unglücklicherweise waren die Reaktionseigenschaften von EuTTA auf die Temperatur in dem Polystyrol schwach. Es scheint, als ob die Benzolringe in dem Polystyrol nachteilig mit den Gruppen in dem EuTTA wechselwirkten, was zu einem Verlust an Aktivität führte. Andererseits ist PMMA ein nichtaromatischer Fluorophor. Von diesem Polymer war bekannt, daß es für UV-Wellenlängen empfindlich ist, welche verwendet werden, um EuTTA anzuregen. Tatsächlich wird UV-Licht oft verwendet, um PMMA zu ätzen. Jedoch wurde nach einem Variieren der Konzentrationen von PMMA : EuTTA : Lösungsmittel : Dehydratisierungsmittel eine Mischung von EuTTA : PMMA bestimmt, welche auf Deckgläschen sehr stabil ist. Diese Mischung kann ohne nachteilige Wirkungen auf die mechanische Stabilität in eine Wasserumgebung eingetaucht werden; ihr Fluoreszenzsignal ist für wenigstens eine Stunde während einer UV-Anregung stabil; Wasser beeinflusst das Fluoreszenzsignal nicht nachteilig; und ihre Fluoreszenz ändert sich um 2,5% bei jedem Grad Änderung in Grad Celsius. Weiterhin ist das Rauschen sehr niedrig (ungefähr 100 : 1), was die Auflösung von Änderungen um 0,01°C erlaubt. Eine graphische Darstellung der Änderung bei der Fluoreszenzintensität mit der Temperatur ist in Fig. 1 dargestellt. In Tabelle 1 wird die Eu(TTA)₃/PMMA-Mischung mit Proben von anderen Fluorophor/Polymerpaaren im Hinblick auf ihre maximale logarithmische Steigung/°C verglichen.

Tabelle 1

Fluorophor	Polymer	Maximale logarithmische Steigung/°C	Temperatur
Anthracen	Celluloseacetat		
Cumarin	PMMA	-0,004	60
CuOEP	GP-197	-0,0113	-100
Erythrosin B	Polycarbonat		
Europium- thenoyltrifluor- acetonat (EuTTA)	Modellflugzeug- lack (model air- plane dope)	-0,036	0
Europium- thenoyltrifluor- acetonat (EuTTA)	PMMA	-0,049	
Europium- thenoyltrifluor- acetonat (EuTTA)	Marathon	-0,0095	
HC-295	GP-197		
La ₂ O ₂ S:Eu(1%)	Feststoff	-0,0031	-150
Perylen	Modellflugzeug- lack	-0,0134	25
Perylendi- carboximid (PDC)	PMMA	-0,007	75
Perylendi- carboximid (PDC)	SOA	-0,06	75
PtOEP	GP-197	-0,0033	10
Pyren	Celluloseacetat		
Pyronin B	PMMA	-0,046	60
Pyronin Y	Modellflugzeug- lack	-0,055	50
Pyronin Y	PMMA	-0,072	75
Pyronin Y	Polycarbonat	-0,0168	50
Chinizarin	Polystyrol	-0,084	90
Rhodamin B	Celluloseacetat	-0,0167	-125
Rhodamin B	PVC	-0,014	-5
Rhodamin B	PVP	+0,057	-30
Rhodamin B	Polyurethan	-0,0175	80
Rhodamin B	Modellflugzeug- lack	-0,018	
Rose Bengal	Ethylcellulose	-0,09	80

Fluorophor	Polymer	Maximale logarithmische Steigung/°C	Temperatur
Rubren	PMMA	-0,034	5
Rubren	SOA		
Rutheniumverb. DJ-171	GP-197		
Rutheniumverb. DJ-201	GP-197	-0,042	0
Rutheniumverb. DJ-275	GP-197	-0,018	0
Rutheniumverb. VG-220-1-2	GP-197	-0,0573	10
Rutheniumverb. VG-225-2	GP-197	-0,0212	-10
Rutheniumverb. VH-127	GP-197	-0,0071	-150
Rutheniumverb. SC-324	GP-197	-0,0233	0
Rutheniumverb. SC-393	GP-197	-0,0343	0
Ruthenium (bpy)/ Zeolit	PVA	-0,0269	40
Ruthenium (trpy)	Ethylcellulose	-0,0131	-140
Ruthenium (trpy)	GP-197	-0,0134	-140
Ruthenium (trpy)	Modellflugzeug- lack		
Ruthenium (trpy)	PMMA		
Ruthenium (trpy)/ Zeolit	PVA	-0,0096	-100
Sulphorhodamin B	Modellflugzeug- lack	-0,0375	105
TTMHD	Feststoff	-0,0293	25

Der Umfang der vorliegenden Erfindung soll nicht durch die hierin beschriebenen spezifischen Ausführungsformen beschränkt werden. Tatsächlich werden den Fachleuten verschiedene Modifikationen der Erfindung, zusätzlich zu jenen, welche hierin beschrieben sind, aus der vorstehenden Beschreibung und den begleitenden Figuren klar werden. Solche Modifikationen sollen in den Umfang der angefügten Ansprüche fallen.

Man sollte weiterhin verstehen, daß alle Basengrößen oder Aminosäuregrößen und alle Molekulargewichts- oder Molekularmassenwerte, welche für Nukleinsäuren oder Polypeptide angegeben werden, ungefähre Werte sind und zur Beschreibung dienen.

Verschiedene Veröffentlichungen werden hierin zitiert, auf deren Offenbarung hierin vollinhaltlich Bezug genommen wird.

Patentansprüche

1. Ein Verfahren zur Feststellung der Temperatur einer Zelle umfassend:

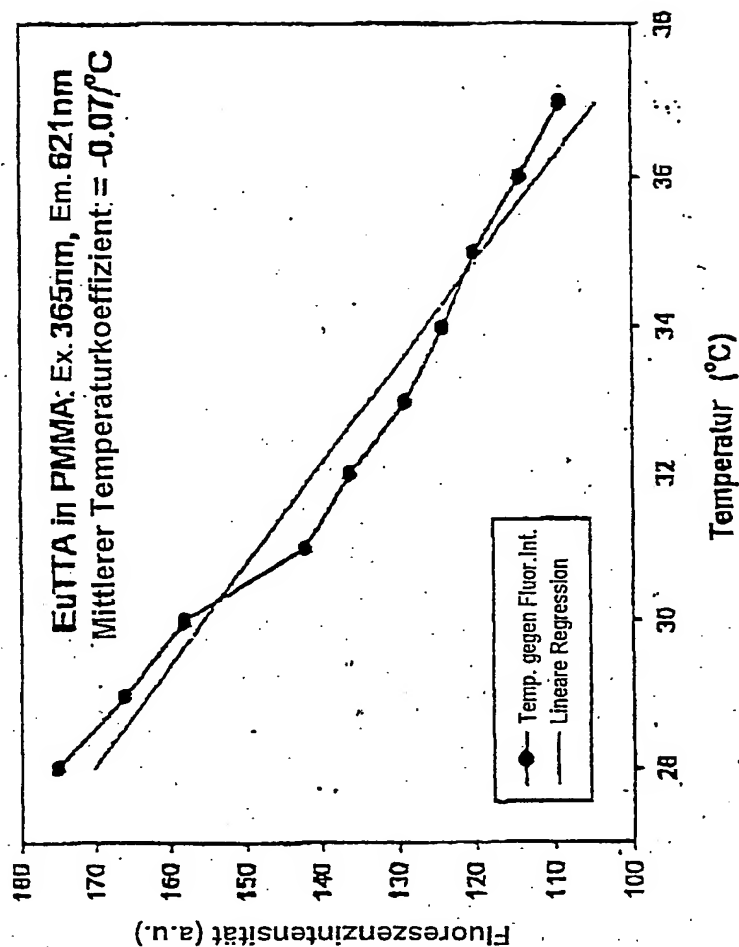
- (a) Anordnen einer Zelle auf einer Stoffwechselsonde, welche ein festes Substrat umfaßt, das einen temperaturempfindlichen Fluorophor eingebettet in ein Polymer enthält, wobei diese, wenn der Fluorophor mit dem geeigneten ultravioletten, sichtbaren oder infraroten Licht angeregt wird, ein nachweisbares Fluoreszenzsignal emittiert und wobei, wenn eine lebende Zelle auf der Stoffwechselsonde angeordnet wird, das Fluoreszenzsignal durch die Stoffwechselgeschwindigkeit der Zelle hervorgerufen wird;

- (b) Anregen des Fluorophors mit dem geeigneten ultravioletten, sichtbaren oder infraroten Licht; und
- (c) Nachweisen des Fluoreszenzsignals, wobei die Intensität des nachgewiesenen Fluoreszenzsignals ein Anzeichen für die Temperatur der Zelle ist.
- 2. Das Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Polymer ein nichtaromatisches synthetisches Polymer ist.
- 3. Das Verfahren nach Anspruch 1, wobei der Fluorophor, während er in ein Polymer eingebettet ist, benachbart zu einer wäßrigen Lösung für wenigstens eine Stunde bei Anregung mit ultraviolettem Licht bei 37 Grad Celsius, pH 7,5 ein stabiles Fluoreszenzsignal ermitteln kann.
- 4. Das Verfahren nach Anspruch 2, wobei das Polymer Poly(methylmethacrylat) ist.
- 5. Das Verfahren nach Anspruch 4, wobei der Fluorophor $\text{Eu}(\text{TIA})_3$ ist.
- 6. Ein Verfahren zum Feststellen der Stoffwechselaktivität einer Zelle, welches ein Feststellen der Temperatur der Zelle durch das Verfahren nach Anspruch 1 und ein Korrelieren der Temperatur mit ihrer Stoffwechselaktivität umfaßt.
- 7. Das Verfahren nach Anspruch 6, wobei die Zelle eine Tumorzelle ist.
- 8. Ein Verfahren zum Feststellen des Vorliegens eines anomalen Metabolismus in einer Zelle, die von gesundem Gewebe umgeben ist, welches ein Feststellen der Temperatur der Zelle durch das Verfahren nach Anspruch 1 umfaßt, wobei ein Unterschied in der Temperatur der Zelle in Bezug auf eine Kontrollzelle ein Anzeichen dafür ist, daß die Zelle einen anomalen Metabolismus durchmacht.
- 9. Das Verfahren nach Anspruch 8, wobei das lebende Gewebe aus einer Tumorbiopsie erhalten wird.
- 10. Das Verfahren nach Anspruch 8, wobei der anomale Metabolismus der Zelle ein Anzeichen für eine ultraviolette Schädigung, eine Kachexie oder eine Apoptosis ist.

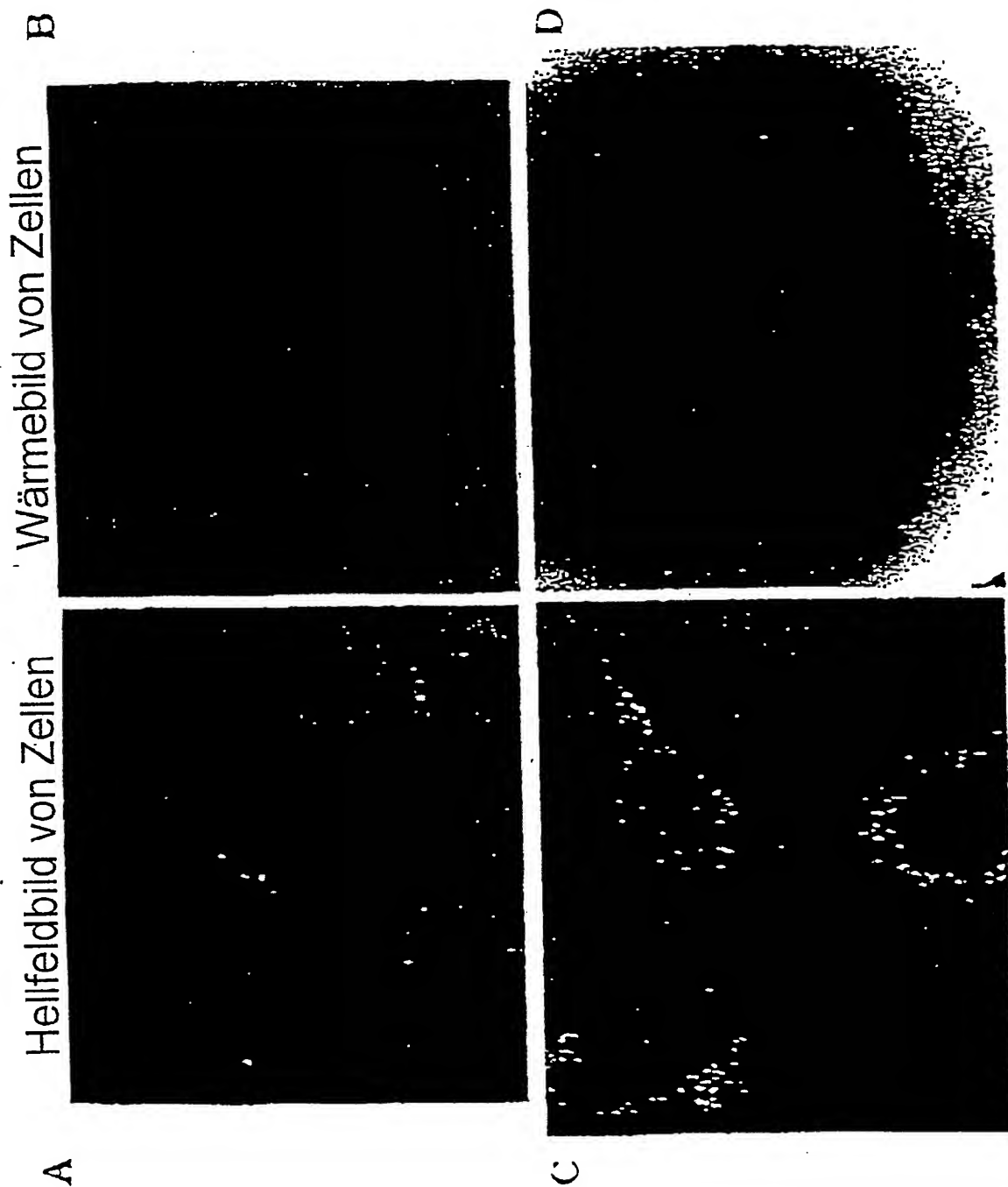
Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

THIS PAGE BLANK (USPTO)



Figur 1



Figur 2